

氏 名 榑 原 恵 子

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第689号

学位授与の日付 平成15年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 分子生物機構論専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Characterization of homeodomain-leucine zipper genes in *Physcomitrella patens* with reference to evolution of homeobox genes in land plants

論 文 審 査 委 員	主 査 教授	西村 幹夫
	教授	長谷部 光泰
	教授	村田 紀夫
	助教授	塚谷 裕一

論文内容の要旨

Land plants have evolved multicellular bodies with specialized cell types in both gametophytes and sporophytes. In the last decade, the molecular mechanisms of sporophyte cell differentiation have been studied extensively, while those in gametophytes are mostly unknown. The moss *Physcomitrella* (*Physcomitrella patens*) is a model for studying gametophyte cell differentiation, because functional gene analysis techniques have been established and its gametophytes are easily observed at the cellular level. Although sporophytes and gametophytes acquired multicellular bodies independently, members of a common gene family may regulate cell differentiation in both gametophytes and sporophytes. To study gametophyte cell differentiation, she first screened *Physcomitrella* gametophytes for homeodomain-leucine zipper (HD-Zip) genes, which are involved in cell differentiation in angiosperm sporophytes.

Chapter 1 describes how 10 HD-Zip genes (named *Pphb1-10*) were isolated from *Physcomitrella*. Phylogenetic analyses comparing moss and angiosperm HD-Zip genes indicated that all the *Pphb* genes, except *Pphb3*, belong to three of the four HD-Zip subfamilies (HD-Zip I, II, and III), and that these subfamilies originated before the divergence of the vascular plant and moss lineages. RNA gel blot analyses showed that eight of the *Pphb* genes were expressed in gametophytes. One of the genes is further characterized in Chapter 2.

Chapter 2 explains how detailed expression analyses and the phenotype of disruptants of *Pphb7* showed that this gene is involved in rhizoid cell differentiation. Rhizoids are multicellular filaments that differentiate from epidermal cells of the stem in gametophytes. *Pphb7* is expressed in rhizoid initial cells and rhizoids. *Pphb7*-disrupted rhizoids have defective pigmentation and an increased number and size of chloroplasts, but the position and number of rhizoids do not differ from the wild type. The role of HD-Zip I genes in the diversification of cell types of moss gametophytes is discussed.

論文の審査結果の要旨

仮根 (rhizoid) は形態学的には根毛に類似した器官である。根を持たない下等植物一般に見られ、高等植物の根のように吸水、植物体の支持という重要な働きをしている。しかし、従来その発生分化様式、およびその分子機構はわかっていなかった。

申請者は遺伝子ターゲティングが容易な唯一の多細胞下等植物であるヒメツリガネゴケを用いて本研究を行った。従来仮根は茎の表皮細胞が不規則に細胞分化することによって生じると考えられてきた。しかし、申請者は仮根が葉の発生段階と密接に関係していることを明らかにした。まずコケの茎葉体は発生初期には葉脈の無い葉 (juvenile leaf)、発生後期には葉脈のある葉 (adult leaf) を形成することに気づいた。そして、juvenile leaf 下方の仮根は不規則分布し、外生オーキシンによって juvenile leaf 下方の全ての細胞が仮根へと分化することを示した。一方、adult leaf 下方の仮根は必ず葉脈の末端に近接した細胞から分化し、外生的にオーキシンを加えても葉脈末端以外からは仮根が分化しないことを明らかにした。これらのことから adult leaf 下方の仮根形成にはオーキシンに加えて葉脈からの未知の因子が必要であることを考察した。

申請者は被子植物の細胞分化に関与しているホメオドメインロイシンジッパー (HD-Zip) 遺伝子に着目し、10個の HD-Zip 遺伝子 (*Physcomitrella patens* homeobox leucine zipper gene: *Pphb1-10*) を単離した。発現様式の解析から、これらの一つ *Pphb7* 遺伝子が仮根特異的に発現することを明らかにした。遺伝子ターゲティングにより *Pphb7* 遺伝子末端に GUS および GFP 遺伝子を導入し、内在プロモーターによる *Pphb7* タンパク質とレポータータンパク質の融合タンパク質の局在を解析した。その結果、融合タンパク質は仮根予定細胞で発現開始し、仮根形成時に先端から数細胞で発現が維持されていることがわかった。次に *Pphb7* 遺伝子破壊体を作成し野生型と比較した。*Pphb7* 遺伝子破壊株は野生型と比べ仮根の形成位置、オーキシンに対する応答性は変化しないが、色素量が減少し、葉緑体数とサイズが増加することがわかった。これらのことから、*Pphb7* 遺伝子は仮根形成位置の決定には関与しないが、仮根の特徴付けに機能していることがわかった。

本研究は仮根形成研究の基礎を築いた点で重要である。そして、茎表皮細胞から仮根細胞への細胞分化が葉脈という多細胞構造によって制御されていることを発見した点は植物発生学上興味深い。さらに、HD-Zip 遺伝子が色素量調整や葉緑体分化に関わっていることを始めて示した点は今後の展開が期待できる。また、本研究の過程で新しいモデル植物であるヒメツリガネゴケを用いて分子生物学的研究をすすめる基盤整備を行った貢献は大きい。よって、申請者の論文は学位論文として十分ふさわしい内容であるものと審査委員会で一致して判定した。

学位論文として提出された研究成果について申請者による口頭発表後、審査委員が研究論文の内容、専門的知識、およびその背景となる基礎的知識について口頭試問により審査を行った。その結果、審査員全員が、研究内容、専門分野に関する知識と理解、関連知識が学位取得に値するものと判定した。

英文で書かれた学位論文及び、その内容の一部が国際専門誌に発表されていることなどから、申請者の語学能力は学位取得に十分であると判断された。

これらの結果をもとに、審査委員会は申請者の持つ研究能力及び、学力は学位取得に値するものと判断した。